



REC'D 31 JAN 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

PRIORITY

DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 JAN. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **5 JAN. 1999**

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 00111**

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **Ly**

DATE DE DÉPÔT **05 JAN. 1999**

**1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**CABINET GERMAIN & MAUREAU
B.P. 6153**

69466 LYON CEDEX 06

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
MD/MK/B05B3271 04 72 69 84 30

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**NUCLEOTIDE FONCTIONNALISE, POLYNUCLEOTIDE EVENTUELLEMENT MARQUE ET PROCEDE DE
DETECTION D'UN ACIDE NUCLEIQUE CIBLE**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

BIO MERIEUX

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE**

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

**Mireille DIDIER
CPI 971202**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

D. GIRAUD

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 00111

TITRE DE L'INVENTION :

Nucléotide fonctionnalisé, polynucléotide éventuellement marqué et
procédé de détection d'un acide nucléique cible

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
69466 LYON CEDEX 06
FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DEFRANC Eric
Grande Rue
38570 GONCELIN

LAAYOUN Ali
1 rue du Rhône
69007 LYON

LHOMME Jean
13 rue des Brandons
38240 MEYLAN

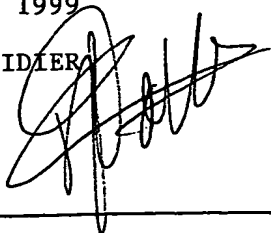
TREVISIOL Emmanuelle
15 Bd du Maréchal Joffre
38000 GRENOBLE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 16 Mars 1999

Mireille DIDIER
CPI 971202



La présente invention concerne un nouveau nucléotide fonctionnalisé par un groupement alkylcétone, un polynucléotide comprenant au moins une unité nucléotidique fonctionnalisée par un groupement alkylcétone, avant et après marquage, ainsi que la mise en oeuvre et les applications de ces produits notamment pour la détection de séquences d'acide nucléique.

Dans le domaine des acides nucléiques, la synthèse de nucléotides fonctionnalisés a été décrite notamment dans le domaine du diagnostic et plus particulièrement pour la préparation de sondes nucléiques marquées utilisables pour la détection d'un acide nucléique cible.

Deux types de problèmes principaux se posent pour l'obtention de ces sondes. Dans un premier temps, le nucléotide fonctionnalisé doit être incorporé dans un polynucléotide. Ensuite, la fonction portée par le nucléotide doit pouvoir réagir sur un traceur de manière spécifique et efficace pour l'utilisation du polynucléotide comme sonde de détection.

Ainsi, le brevet EP 0407816 décrit des dérivés de l'uracile modifiés en position 5 pour la fabrication de sondes par voie chimique ou enzymatique. Toujours dans le même but, les brevets WO 86/06726 et EP 0212951 décrivent des dérivés de la cytosine modifiés en position 4. Le brevet EP 0254646 décrit un dérivé d'adénosine modifié en position 8.

Le brevet WO 92/00989 décrit une application particulière de nucléotides modifiés pour l'introduction de protéines sur un polynucléotide.

La demande de brevet WO 98/05766 de la demanderesse pose le problème de l'incorporation de nucléotides fonctionnalisés pouvant être incorporés par réaction enzymatique et notamment par les techniques d'amplification enzymatique non plus pour la préparation de sondes marquées mais directement pour générer une cible marquée. Dans ce cas, le besoin en sensibilité est plus

important et le choix du nucléotide fonctionnalisé est crucial pour obtenir la sensibilité adéquate.

Un certain nombre de fonctions nucléophiles comme les fonctions amines et alcoxyamine, ou électrophiles
5 comme la fonction aldéhyde sont décrites qui permettent une incorporation efficace du nucléotide fonctionnalisé au cours de l'amplification mais il subsiste néanmoins un besoin de nucléotide fonctionnalisé encore plus efficace, notamment en terme de facilité de préparation, en terme de
10 neutralité vis à vis des réactions enzymatiques ou chimiques et en terme de réactivité pour le marquage de ce nucléotide par un traceur après incorporation.

Il a été trouvé par la demanderesse que la fonction alkylcétone répondait de manière surprenante aux
15 inconvénients précités.

En effet, si l'art antérieur décrit l'utilisation de motifs R-CO- où R est un groupement alkyle dans le cas de la synthèse d'oligonucléotides (WO 93/22326), le but de cette fonction est de protéger l'amine exocyclique des
20 bases. A la fin de la synthèse, l'amine est déprotégée par action d'un agent alcalin. La fonction alkylcétone telle que définie dans la présente invention est suffisamment stable pour résister à ce type de traitement, ne représente donc pas un groupement protecteur et sa
25 stabilité par rapport aux différentes méthodes de synthèse chimique a pour conséquence une facilité plus grande de préparation notamment par rapport à des fonctions amines, aldéhydes ou alcoxyamines comme décrit dans le brevet WO 98/05766.

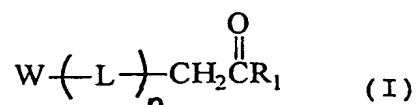
30 De même dans les brevets cités précédemment (EP 0407816, WO 86/06726, EP 0212951, EP 0254646 et WO 92/00989) les fonctions décrites pour fonctionnaliser les nucléotides sont choisies parmi les fonctions réactives du point de vue chimique comme les fonctions
35 amine et thiol éventuellement protégées. Si ces fonctions sont protégées, une étape de déprotection est nécessaire,

ce qui complique l'étape de marquage. Si ces fonctions sont libres, une inhibition de la réaction enzymatique ou des réactions secondaires dans le cas de la synthèse chimique peuvent se produire.

5 Cette stabilité chimique de la fonction alkylcétone ne devrait pas en faire un bon candidat pour une réaction de couplage sur un marqueur et pourtant la présente invention démontre que, de manière surprenante, cette fonction est réactive pour le marquage et que de
10 plus la détection du produit après marquage est très sensible.

Enfin, les nucléotides portant cette fonction présentent une neutralité excellente vis à vis des réaction enzymatique puisque il est possible de remplacer
15 complètement un nucléotide naturel par un nucléotide portant cette fonction alkylcétone dans une réaction enzymatique sans affecter le rendement de cette réaction et plus surprenant encore en l'améliorant dans certains cas.

20 C'est l'objet de la présente invention de décrire un nouveau composé comportant cette fonction alkylcétone et de formule (I) ci-dessous :



25

dans laquelle

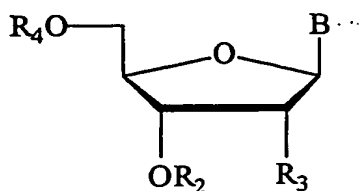
- W représente un analogue nucléotidique ;
- L représente un bras de liaison entre W et le groupement alkylcétone ; le bras de liaison L est
30 notamment choisi parmi les chaînes hydrocarbonées saturées ou insaturées, éventuellement interrompues par au moins une fonction amine, amide ou oxy ; de préférence, le bras de liaison comporte un enchaînement de 1 à 30 atomes ; en particulier, le bras de liaison comporte de 4 à 20 atomes
35 dont au moins une fonction amide ;

- n représente un indice égal à 0 ou 1 ;

- R₁ représente une chaîne alkyle, éventuellement substituée, de préférence une chaîne alkyle ayant au plus 6 carbones ; avantageusement R₁ est un groupement méthyle.

5 Par analogue nucléotidique, on entend un nucléoside ou un nucléotide, un nucléoside ou un nucléotide portant une ou plusieurs modifications sur un des éléments constitutifs dudit nucléoside ou nucléotide comme une modification du sucre désoxyribose ou ribose
10 comme le xylose, l'arabinose, les sucre de configuration alpha (FR 2 607 507), les PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., (1992), 114, 1895-1897), les analogues de sucre comme le 4'-thio ribose ou désoxyribose, les sucres de configurations D ou L ; une modification de la base
15 azotée ; une modification du phosphate ou de son équivalent pour les nucléotides ainsi que l'ensemble des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse chimique.

Avantageusement, le composé répond à la formule
20 (I) dans laquelle W a la formule générale (II) :



(II)

dans laquelle :

- 25 - R₂ représente H ou un groupement protecteur ;
- R₃ représente H, F, OH, SH, NH₂, OCH₃ ou OR₅ où R₅ représente un groupement protecteur ou une chaîne alkyle ;
- R₄ représente un radical H, un groupement
30 protecteur ou un groupement mono, di ou triphosphate ;
- W étant lié à (L)_n par l'intermédiaire de B.

La base azotée est choisie notamment parmi les purines ou pyrimidines comme l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation comme les bases modifiées naturelles (telles que la 6-céto-purine, la xanthine, la 5-méthyl-cytosine, la 2-amino-purine) ou non naturelles (telles que la thioguanine ou la 8-oxo-guanine, déazapurine, azapurine), ou des analogues de bases comme les bases universelles (telles que les dérivés nébularine, nitroindole ou nitropyrrole). Certaines fonctions des bases susceptibles d'interférer avec les stratégies de synthèse chimique en phase solide ou liquide peuvent être protégés par des groupements protecteurs appropriés.

Préférentiellement, la base azotée est l'adénine, l'uracile, la cytosine.

Le bras de liaison L est greffé sur une position quelconque de la base azotée ou de son analogue. De préférence le bras de liaison sera greffée sur une position ne perturbant pas l'hybridation. En particulier, le bras de liaison sera fixé sur l'amine en position 4 de la cytosine, la position 5 de l'uracile ou l'amine en position 6 de l'adénine.

Par groupement protecteur, on entend les groupements utilisés de manière classique dans la synthèse chimique de nucléosides, nucléotides et oligonucléotides (voir par exemple Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Edited by Leroy B. Townsend, Plenum Press, New York and London et Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties, Edited by S. Agrawal, Humana Press, Totowa, New Jersey). De préférence dans le cas de la synthèse chimique, R_4 est un groupement 4,4'-diméthoxy trityle et R_2 est un groupement 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite et R_3 est H ou OR_5 , où R_5 est un groupement protecteur utilisé en synthèse d'oligoribonucléotide.

De préférence dans le cas de la synthèse enzymatique, R_4 est un groupement triphosphate, R_2 est H et R_3 est OH.

Les groupements phosphate sont généralement sous
5 forme de sels, et particulièrement des sels de lithium, de sodium, ou de triéthylammonium acétate.

L'invention concerne aussi un polynucléotide fonctionnalisé comprenant au moins un nucléotide fonctionnalisé tel que défini précédemment. Il peut être
10 synthétisé par réaction chimique et/ou enzymatique. Dans le cas d'une synthèse par réaction enzymatique et notamment dans le cas d'une amplification enzymatique, la neutralité du nucléotide fonctionnalisé vis à vis des réactions enzymatiques permet l'incorporation de plusieurs
15 nucléotides fonctionnalisés.

Par réaction enzymatique, on inclut toutes les réactions au cours desquelles intervient au moins une enzyme dont l'activité est liée à un nucléotide. Ainsi on entend toutes réactions comprenant au moins une étape
20 enzymatique dans laquelle un nucléotide sert de substrat à l'enzyme, que ledit nucléotide soit transformé ou non au cours de cette étape enzymatique. A titre d'exemple de telles réactions sont choisies parmi celles utilisées dans les techniques de biologie moléculaire telles que la
25 transcription, la ligation, l'élongation, la coupure et plus particulièrement dans les techniques d'amplification (voir par exemple l'article de E. Winn-Deen, Journal of Clinical assay, vol 19, p21-26, (1996)).

Ainsi les enzymes dont les activités sont liées à
30 des nucléotides peuvent en particulier être sélectionnées dans la liste non exhaustive suivante : les ADN polymérases ADN dépendantes telles que le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I de *E. Coli* , la TAQ polymérase, les T7, T4 ou T5 ADN polymérases, les
35 polymérases eucaryotes cellulaires ou virales, les ADN polymérases ARN dépendantes telles que les polymérases de

AMV (Avian Myoblastosis Virus), de MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) ; les ARN polymérases telles que les T7, T3 SP6, N4, PBSII ARN polymérases, l'ARN polymérases de *E. Coli* ; les enzymes à activité nucléasiques telles que les
5 endonucléases de restriction, la Rnase H ; ou encore les polyA polymérases, les répliques comme la Q-béta-réplique, les terminal transférase ou les ligases.

Les enzymes thermostables présentant les activités enzymatiques décrites ci-dessus sont aussi utilisables
10 dans l'invention.

Selon un mode préféré, on choisira pour la synthèse du polynucléotide fonctionnalisés les techniques utilisant une étape de transcription comme la NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), la TMA
15 (Transcription Mediated Amplification) ou une transcription post PCR (Polymerase Chain Reaction) comme décrit dans les articles de R.J. Lipshutz et al., Biotechniques, 19(3), p442-447, 1995 ou M. Kozal et al, Nature Medicine, 2(7), p753-759, 1996.

Les éléments et conditions nécessaires à la mise en oeuvre de ces réactions enzymatiques pour obtenir un polynucléotide sont bien connus de l'homme de métier. L'ouvrage Current Protocols in Molecular Biology, édité par F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore J.G.
25 Seidman, J.A. Smith et K. Struhl, John Wiley & Sons, 1996 volume 1 chapitre 3 indique les méthodes de manipulation enzymatique de l'ADN et l'ARN. De même, l'ouvrage « Molecular Methods for Virus Detection » édité par D.L. Wiedbrand et D.H. Farkas, Academic press, San Diego, 1995
30 notamment dans les chapitres 8, 9, 12, 13, 14, 15 et 16 donne des exemples pour les techniques d'amplification enzymatique.

Par synthèse chimique, on entend toutes les méthodes aussi bien en phase solide qu'en phase liquide
35 dans lesquelles un monomère nucléotidique convenablement

protégé réagit avec un autre monomère ou polymère nucléotidique par une réaction de couplage.

Les méthodes de synthèse chimique sont données par exemple dans « Methods in Molecular Biology, volume 20, 5 Protocols for oligonucleotides and analogs », édité par S. Agrawal, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993 et « Methods in Molecular Biology, volume 26, Protocols for oligonucleotides conjugates », édité par S. Agrawal, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1994.

10 Par polynucléotide, on entend un enchaînement d'au moins 2 monomères nucléotidiques. De préférence, si le polynucléotide est synthétisé par voie chimique, la taille est inférieure à 300 nucléotides et avantageusement à 150. De préférence, si le polynucléotide est synthétisé 15 par réaction enzymatique, la taille est inférieure à 20 kb et avantageusement inférieure à 10 kb.

Les deux voies de synthèse chimique et enzymatique peuvent être combinées pour préparer un polynucléotide .

L'invention concerne aussi un polynucléotide 20 fonctionnalisé marqué comprenant au moins un nucléotide fonctionnalisé de l'invention, dont le groupement alkylcétone a interagi avec un réactif de marquage.

Par réactif de marquage, on entend un traceur générant directement ou indirectement un signal détectable 25 et susceptible de réagir avec la fonction alkylcétone.

Une liste non limitative de ces traceurs suit :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, 30 la bêta galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase ;

- les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants ;

- les groupements à densité électronique 35 détectable par microscopie électronique ou par leur

propriété électrique comme la conductivité, l'ampérométrie, la voltamétrie, les mesures d'impédance ;

- les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel ;

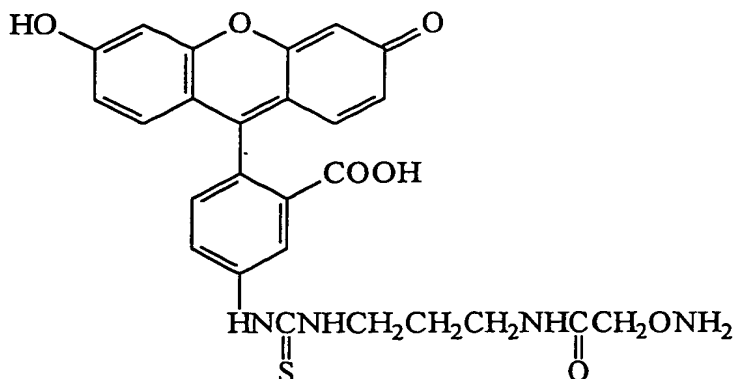
- les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I .

De préférence, le traceur est un composé fluorescent de faible encombrement stérique comme la fluorescéine, le dansyle, les chromophores du type IR (LiCOR Inc, Lincoln NE, USA), CY5 et CY3 (Randolph J.B. and al, Nucleic Acids Res., 25(14), p2923-2929, 1997) et leurs dérivés. Par faible encombrement stérique, on entend un poids moléculaire inférieur à 1000 g/mole.

Pour réagir avec la fonction alkylcétone, ce réactif de marquage doit porter une fonction nucléophile susceptible de réagir avec une fonction alkylcétone comme les fonctions alcoxyamine ou hydrazine.

De préférence, la fonction choisie est l'alcoxyamine qui peut être introduite par tous moyens directs ou indirects. Par moyen direct on entend une liaison covalente entre le traceur ou une molécule portant le traceur et la fonction alcoxyamine. Par moyen indirect, on entend les systèmes de complexation du type métal/chélate ou les systèmes d'affinité c'est à dire les haptènes détectables par un anticorps spécifique ou une protéine comme le couple biotine/avidine ou streptavidine, sucre/lectine. Dans ce cas c'est l'anticorps ou la protéine qui porte le traceur et c'est l'haptène qui porte la fonction alcoxyamine.

En particulier le réactif de marquage est de formule :



L'invention concerne aussi un procédé de détection
 5 d'un acide nucléique cible dans un échantillon dans lequel
 on met en contact cet acide nucléique cible éventuellement
 prétraité avec au moins un nucléotide fonctionnalisé, en
 présence des éléments et dans des conditions nécessaires à
 l'obtention d'un polynucléotide de l'invention, pour
 10 obtenir un polynucléotide fonctionnalisé ; à marquer ledit
 polynucléotide avec un réactif de marquage puis à détecter
 ledit polynucléotide marqué. Les éléments et conditions
 précitées sont bien connus de l'homme du métier.

Par prétraitement, on entend les différentes
 15 étapes de traitement de l'échantillon pour rendre
 accessible l'acide nucléique cible, comme par exemple, la
 lyse, la fluidification, la concentration.

De préférence le polynucléotide fonctionnalisé est
 obtenu par une réaction d'amplification enzymatique qui
 20 agit sur l'acide nucléique cible qui sert de matrice et
 qui est capable d'incorporer le nucléotide fonctionnalisé.

Avantageusement la technique d'amplification
 enzymatique est la NASBA (Nucleic Acid Sequence Based
 Amplification), la TMA (Transcription Mediated
 25 Amplification) ou une transcription post PCR (Polymerase
 Chain Reaction) comme décrit dans les articles de R.J.
 Lipshutz et al., Biotechniques, 19(3), p442-447, 1995 ou
 M. Kozal et al, Nature Medecine , 2(7), p753-759, 1996.

Le polynucléotide marqué peut être détecté qualitativement et/ou quantitativement en phase homogène ou hétérogène. Un mode préférentiel de détection consiste à fixer le polynucléotide marqué sur un support solide par l'intermédiaire d'une réaction d'hybridation entre le polynucléotide marqué et un autre polynucléotide lui même fixé sur le support solide puis à révéler la présence du polynucléotide marqué après une étape de lavage. Cette révélation se fait directement par lecture comme par exemple avec un scanner ou une caméra si le traceur est une molécule fluorescente.

Le procédé de détection est particulièrement utile dans le cas où une multitude de polynucléotides sont fixés sur le support solide à une position prédéterminée pour former une « puce à ADN ».

En effet, la densité des polynucléotides fixés sur le support solide imposent des contraintes stériques importantes lors de l'hybridation et le polynucléotide marqué selon l'invention permet une bonne sensibilité de détection. Des exemples de ces puces sont donnés par exemple dans les publications de G. Ramsay, *Nature Biotechnology*, 16, p40-44, 1998; F. Ginot, *Human Mutation*, 10, p1-10, 1997 ; J. Cheng et al, *Molecular diagnosis*, 1(3), p183-200, 1996 ; T. Livache et al, *Nucleic Acids Research*, 22(15), p2915-2921, 1994 ; J. Cheng et al, *Nature Biotechnology*, 16, p541-546, 1998.

Le procédé de détection est applicable pour le séquençage, le profil d'expression des ARN messagers ou le criblage de mutation, le diagnostic de maladies infectieuses ou génétiques.

Une étape de fragmentation peut avoir lieu pour favoriser l'hybridation du polynucléotide marqué sur la puce à ADN, avant, conjointement ou après l'étape de marquage.

L'invention concerne en outre un procédé de détection d'un acide nucléique cible dans un échantillon

dans lequel on met en contact cet acide nucléique cible avec un polynucléotide fonctionnalisé de l'invention, on fait réagir le réactif de marquage et l'on détecte la présence de l'acide nucléique cible.

5 Un autre moyen de pratiquer l'invention est de faire réagir, avant l'hybridation avec l'acide nucléique cible, le polynucléotide fonctionnalisé et le réactif de marquage. Cet acide nucléique cible peut avoir été amplifié par une technique d'amplification enzymatique.

10 Enfin, l'invention concerne le procédé de détection d'un acide nucléique cible selon lequel on dispose d'un polynucléotide marqué de l'invention, on met en contact l'acide nucléique avec le polynucléotide marqué et on détecte la présence de l'acide nucléique cible.

15 Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un polynucléotide pour une utilisation dans des tests diagnostiques et dans des processus de séparation. Des matériaux naturels ou de synthèse, modifiés ou non
20 chimiquement peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, du dextran ; des polymères tels que
25 polychlorures de vinyle, polyéthylènes, polystyrènes, polyacrylates, polyamides, ou des copolymères à base de monomères du type styrène, esters d'acides carboxyliques insaturés, chlorure de vinylidène, diènes ou composés présentant des fonctions nitrile (comme l'acrylonitrile) ;
30 des copolymères chlorure de vinyle/propylène, chlorure de vinyle/acétate de vinyle ; des fibres naturelles telles que le coton et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux inorganiques tels que la silice, le quartz des verres, des céramiques ; des latex, c'est-à-
35 dire des dispersions aqueuses colloïdales d'un polymère

quelconque insoluble dans l'eau; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc.

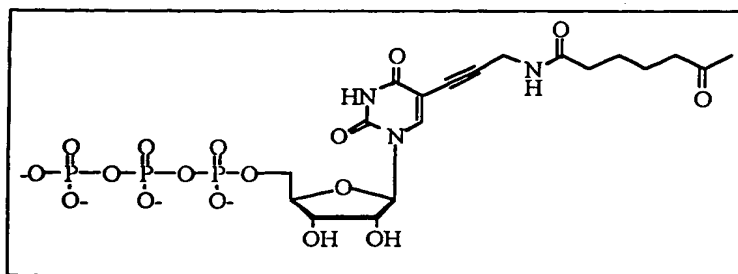
Les exemples qui suivent permettent d'illustrer quelques avantages de l'invention sans toutefois en limiter la portée.

La Figure annexée représente les rendements de transcription mesurés en fonction du nucléotide utilisé.

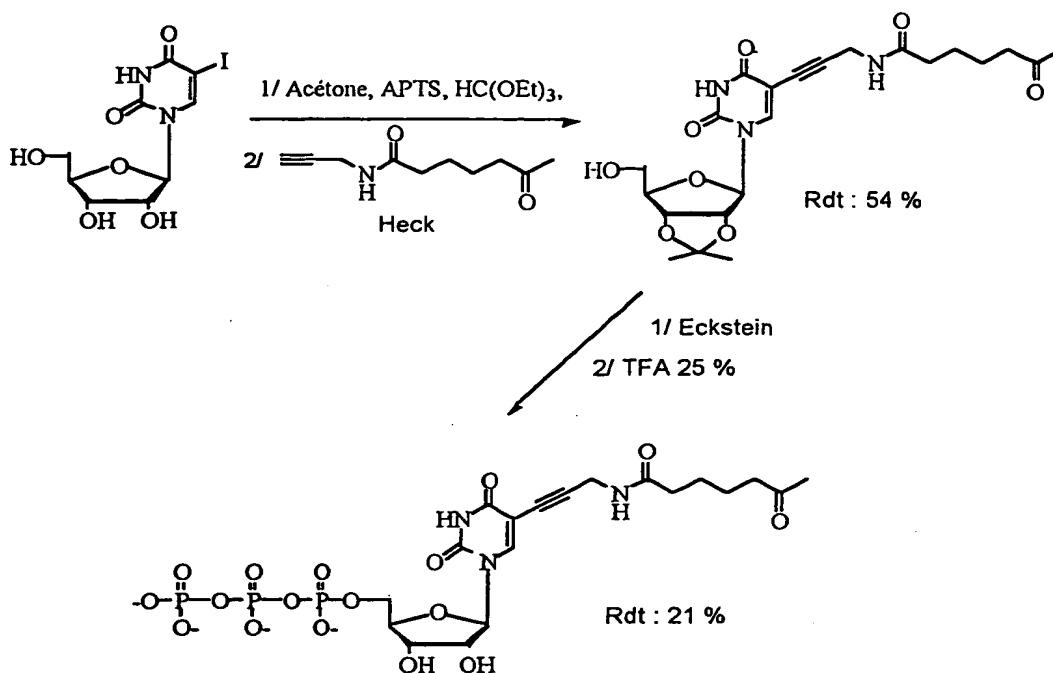
EXEMPLE I : SYNTHESE DE NUCLEOTIDES METHYLCETONES

10

I.1. Synthèse de l'Uridine(C5)-C9-méthylcétone 1

1

Voie de synthèse :



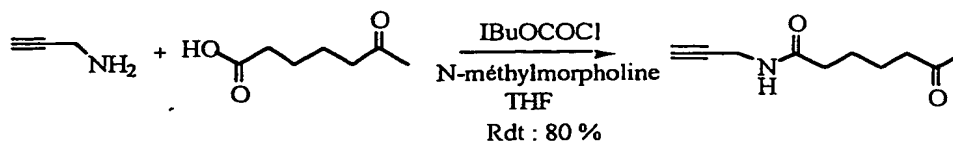
5 La protection des positions 2',3'-OH est réalisée par action de l'acétone en milieu acide selon le protocole décrit dans "Nucleic acid chemistry, Editors Townsend-Tipson, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, p 765-766 (1978)".

10

Synthèse de la chaîne méthylcétone

L'introduction du motif méthylcétone sur le bras se fait par couplage peptidique entre la propargylamine et l'acide 6-oxo-heptanoïque.

15



On solubilise l'acide 6-oxo-heptanoïque (2,75 g, 18,16 mmol) dans 40 ml de THF anhydre. La solution est

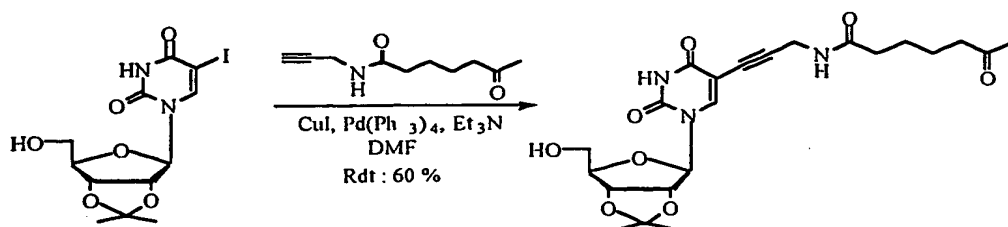
placée à 0°C sous atmosphère d'argon. On ajoute alors la N-méthylmorpholine (2ml, 18,16 mmol) puis la propargylamine (1,25 ml, 18,16 mmol) après 15 min et on laisse revenir à température ambiante. Après 30 minutes de
 5 réaction, on filtre le précipité et on évapore à sec.

Le résidu obtenu est repris dans du dichlorométhane et est lavé avec une solution aqueuse de soude 0,1N puis avec une solution aqueuse de l'acide chlorhydrique 1N et enfin avec de l'eau saturée en
 10 chlorure de sodium.

Après séchage sur Na₂SO₄, le dichlorométhane est évaporé et le résidu est chromatographié sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle). On obtient ainsi le produit sous forme d'une poudre blanche (2,6 g, 14,4 mmol ; 80 %).

15 La chaîne méthylcétone a été caractérisée par RMN du proton, RMN du Carbone 13 et par spectrométrie de masse.

Introduction de la chaîne méthylcétone sur le
 20 *nucléoside : couplage de Heck (Hobbs, J. Org. Chem., 1989, 54, 3420-3422)*



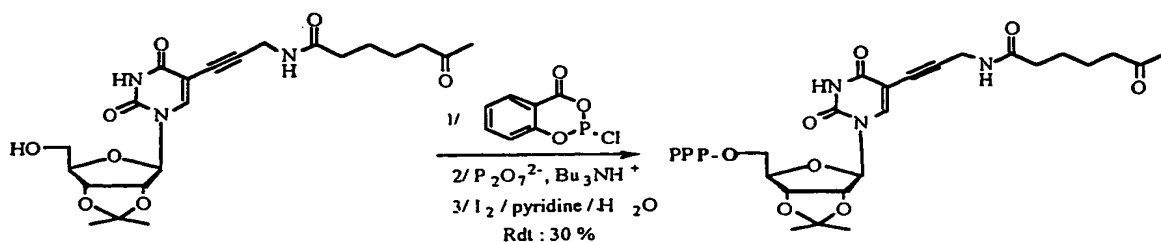
25 A 5 ml de DMF dégazés et placés sous argon, on ajoute de la 5-iodouridine 2',3'-isopropylidène (500 mg ; 1,22 mmol) et de l'iodure de cuivre (44 mg, 0,232 mmol). La réaction est placée à l'obscurité puis on ajoute de la triéthylamine (323 µl, 2,32 mmol) et la chaîne contenant
 30 la fonction méthylcétone (630 mg, 3,48 mmol).

Le mélange est laissé sous argon pendant 10 minutes. On ajoute alors le tétrakis-triphénylphosphine palladium (134 mg, 0,116 mmol). Après 3 heures de réaction, on évapore la DMF et on coévapore avec de l'acétonitrile. Le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. Après séchage sur Na_2SO_4 et évaporation, le résidu est chromatographié sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/méthanol : 90/10).

Après évaporation on obtient le nucléoside méthylcétone sous forme d'une poudre blanchâtre (340 mg, 0,73 mmol, 60 %). Le produit a été caractérisé par RMN du proton, du Carbone 13 et par spectrométrie de masse. On obtient ainsi le nucléoside méthylcétone correctement protégé pour l'introduction du triphosphate en 5'.

Obtention du nucléoside uridine(C5)-C9-méthylcétone triphosphate 1

Phosphorylation : Eckstein, J. Org. Chem., 1989, 54, 631-635

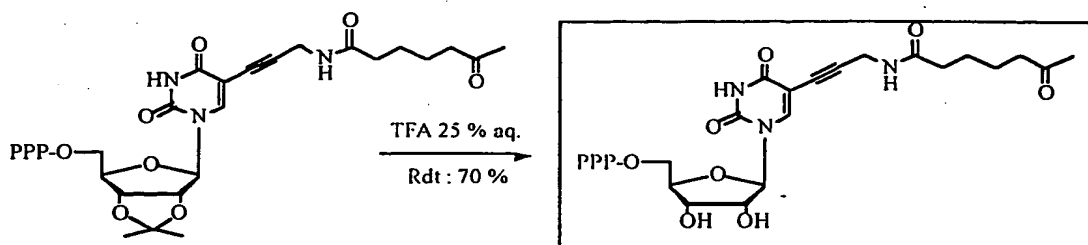


Le nucléoside méthylcétone (46 mg, 0,1 mmol) est dissous dans de la pyridine anhydre et est évaporé 2 fois. On ajoute alors sous argon 100 ml de pyridine, 300 ml de dioxane et une solution fraîchement préparée de 2-chloro-4H-1,2,3-dioxaphosphorin-4-one (1 M) dans du dioxane (130 μl ; 130 μmol), on laisse l'agitation pendant 20

minutes puis on ajoute une solution 0,5 M de pyrophosphate de tributylammonium dans de la DMF anhydre (320 μ l, 0,16 mmol) et simultanément 130 μ l de tributylamine. Après 30 minutes, on ajoute 2 ml d'une solution d'iode à 1 % dans un mélange pyridine / eau (98/2 : v/v).

Après 20 minutes d'agitation, on détruit l'excès d'iode avec une solution aqueuse de NaHSO₃ à 5 % et on maintient l'agitation pendant 10 minutes. On évapore à sec et on effectue une extraction avec un mélange eau/dichlorométhane. La phase aqueuse est évaporée puis on effectue une chromatographie (flash) en phase inverse C18 (éluant : eau/méthanol 1/1). Les fractions contenant le produit sont évaporées et l'échange de contre ion est réalisé par passage sur résine Dowex, Na⁺. On récupère ainsi le triphosphate protégé (0,03 mmol ; 30%).

Déprotection



20

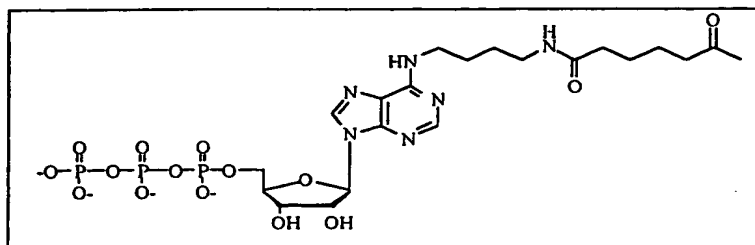
1

Le triphosphate protégé (0,03 mmol) est repris dans 15 ml d'eau milli-Q auxquels 15 ml d'une solution aqueuse de TFA à 25 % sont ajoutés. La solution est agitée pendant 15 minutes puis on évapore et coévapore 2 fois avec de l'eau.

On reprend dans 10 ml d'eau milli-Q et on neutralise avec de la soude 0,1 N jusqu'à pH 8. Après l'évaporation le triphosphate protégé est purifié sur phase inverse C18 (H₂O puis H₂O/MeOH, 1/1). L'échange de

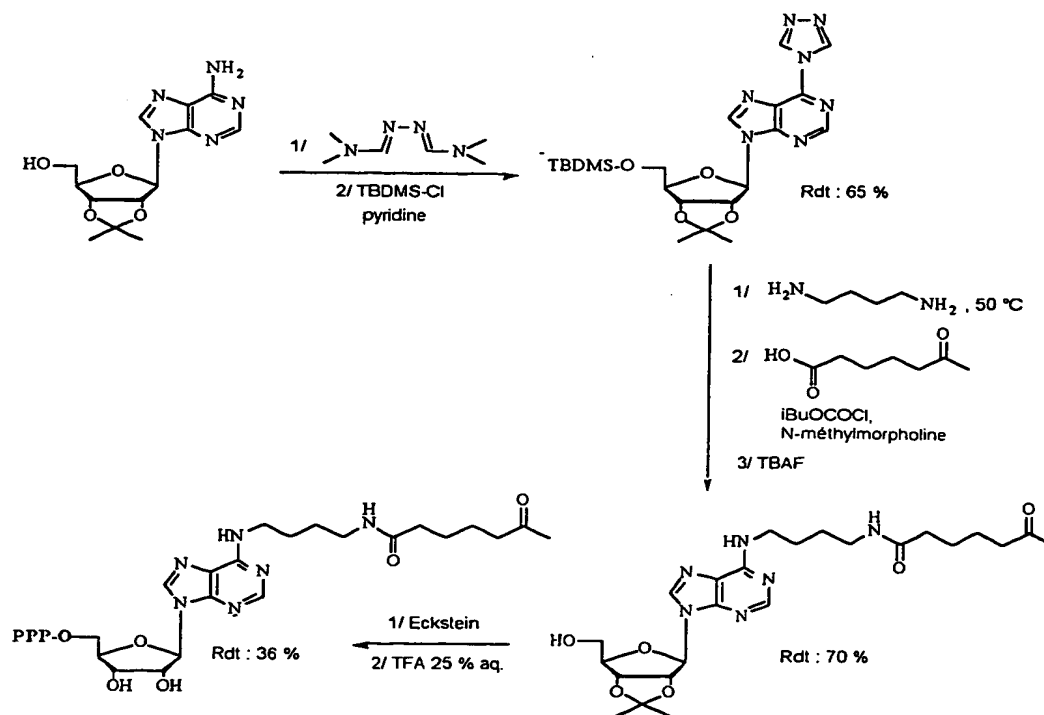
30

2



Voie de synthèse

L'introduction du diaminobutane en position 6 de
15 l'adénosine est réalisée par substitution du groupement
triazolo porté par le nucléoside intermédiaire protégé. La
fonction méthylcétone est ensuite introduite par couplage
peptidique au niveau nucléosidique. Après déprotection du
groupement silyle en 5', la phosphorylation est effectuée
20 par la méthode de Eckstein. Après déprotection on obtient
le triphosphate attendu, caractérisé par RMN du proton, du
phosphore 31.



2

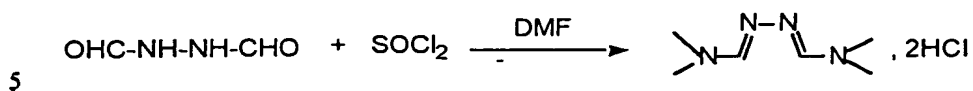
Synthèse du nucléoside triazolo protégé

5 Préparation de l'adénosine 2', 3'-isopropyldène

(Nucleic Acid Chemistry, part 2, Editors Townsend, Tipson, Wiley Interscience, John Wiley & Sons p. 768, (1978))

A une suspension d'adénosine (5 g, 18,7 mmol) dans
 10 de l'acétone (10 ml) contenant de l'APTS (acide para-
 toluène sulfonique) (3,9 g, 20,6 mmol), on ajoute goutte à
 goutte sous argon de l'orthoformate d'éthyle (12,44 ml,
 74,8 mmol). Après une nuit de réaction, on ajoute 110 ml
 d'eau contenant 1,86 ml d'ammoniaque à 27 %. Après 30
 15 minutes d'agitation, le milieu réactionnel est évaporé
 jusqu'à apparition de cristaux blancs. Après 12 h à +4°C,
 on obtient un précipité blanc que l'on recristallise dans
 l'eau. On obtient 4,17 g (13,5 mmol, 72 %) de produit sous
 forme d'une poudre blanche. Cet intermédiaire a été
 20 caractérisé par RMN du proton.

Synthèse de l'amidine (Bartlett et Humphreg, J. Chem. Soc., 1967, 1664-1666)



Le chlorure de thionyle (39,96 g, 24,5 ml, 0,338 mol) est ajouté goutte à goutte au N-N'-diformylhydrazine (12 g, 0,136 mol) dans le DMF (270 ml) à 10°C. Le mélange devient jaune. On maintient l'agitation pendant 2 jours.
10 Le précipité obtenu est filtré et lavé par de la DMF puis par de l'éther. Après séchage sous vide, on obtient l'amidine avec un rendement de 95 % (28 g, 0,130 mol).

Préparation de l'intermédiaire triazolo (Samano, 15 Miles, Robins, J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 9331-9332)

L'adénosine-isopropylidène (1 g, 3,2 mmol) et l'amidine décrite ci-dessus (1,4 g, 6,5 mmol) sont agitées dans de la pyridine (15 ml) à 100°C sous argon pendant 48 h. La pyridine est alors évaporée et coévaporée avec du
20 toluène. L'huile obtenue est ensuite reprise par de l'acétate d'éthyle et cette phase organique est lavée avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage sur Na₂SO₄ et évaporation, on obtient le nucléoside triazolo sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 60 % (700 mg,
25 1,9 mmol). Il a été ensuite caractérisé par RMN du proton.

Protection en 5'-du dérivé triazolo

On solubilise le nucléoside triazolo (1 g, 2,8 mmol) dans 20 ml de pyridine. On ajoute à 0°C sous argon
30 le (TBDMS - Cl, Chlorure de terbutyldiméthylsilyle), (462 mg, 3 mmol). On maintient l'agitation pendant deux heures puis on évapore la pyridine. Le résidu ainsi obtenu est chromatographié sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂:Méthanol : 95/5). Après évaporation, on obtient

l'adénosine intermédiaire totalement protégé sous forme d'une poudre blanche (1,25 mg, 2,6 mmol, 93 %). Ce nucléoside a été caractérisé par RMN du proton, du carbone 13 et par spectrométrie de masse.

5

Introduction de la chaîne diaminobutane sur l'adénosine intermédiaire protégé

L'adénosine triazolo (1,25 mg, 2,64 mmol) est solubilisé dans 10 ml d'acétonitrile. On ajoute alors la
10 diaminobutane (2,7 ml, 25,4 mmol) et on agite à 50°C sous argon. Après 5 heures, on évapore le solvant et on reprend le résidu dans de l'acétate d'éthyle. On lave cette phase organique avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage sur Na₂SO₄ et évaporation en chromatographie sur gel de silice
15 (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH : 8/2, puis CH₂Cl₂ / MeOH : 8/2 en présence de 2% d'ammoniaque).

Après évaporation, on obtient le produit sous forme d'une huile (1 g, 2 mmol, 80%).

Le nucléoside aminé a été caractérisé par RMN du
20 proton, du carbone 13 et par spectrométrie de masse.

Couplage à la chaîne méthylcétone et déprotection en 5'

L'acide 6-oxo-heptanoïque (288 mg, 2 mmol) est
25 dissous dans 5 ml de THF anhydre. On place la solution à 0°C sous argon. On ajoute alors la N-méthylmorpholine (223 µl, 2 mmol) et après 5 min, le dichloroformiate d'isobutyle (258 µl, 2 mmol). Après 15 minutes, on rajoute le nucléoside aminé. Après 2 heures, on évapore le THF et
30 on reprend le résidu par de l'éther. On lave avec une solution aqueuse de NaOH 1N puis avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage sur Na₂SO₄ et évaporation on obtient une huile. On effectue la désilylation en reprenant l'huile dans 10ml de THF auxquels on ajoute du TBAF (3,25

ml d'une solution de 1M dans THF). Après une heure on évapore le solvant. On solubilise le résidu dans du dichlorométhane et on effectue un lavage avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage et évaporation, le résidu
 5 est chromatographié sur gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 , puis CH_2Cl_2 / MeOH : 95/5).

Après évaporation on obtient 870 mg du nucléoside portant la fonction méthylcétone et déprotégé en 5' (1,7 mmol, 85 % sur 2 étapes). Il est caractérisé par RMN du
 10 proton, du carbone 13 et par spectrométrie de masse.

Phosphorylation et obtention du nucléotide Adénosine-(N6)-C10-méthylcétone 2

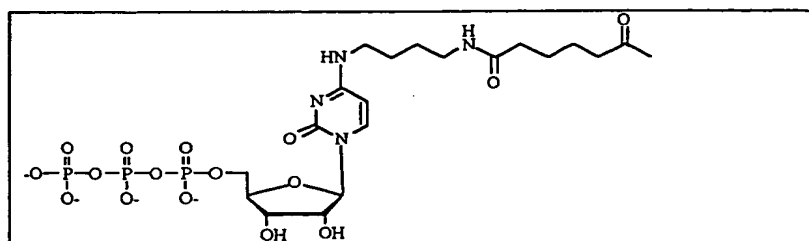
L'adénosine-(N6)-C10-méthylcétone protégé en 2',
 15 3' par l'isopropylidène est dissous dans de la pyridine anhydre et est évaporée deux fois. On ajoute alors sous argon 500 μl de pyridine, 1,5 ml de dioxane et une solution fraîchement préparée de 2-chloro 4H-1,2,3-dioxaphosphain-4-one (1 M) dans le dioxane (650 μl , 0,65
 20 mmol). On laisse l'agitation pendant 20 minutes puis on ajoute une solution 0,5 M de pyrophosphate de tributylamonium dans de la DMF anhydre (1,6 ml, 0,8 mmol) et simultanément 650 μl de tributylamine.

Après 30 minutes, on ajoute 10 ml d'une solution
 25 d'iode à 1 % dans un mélange pyridine/eau (98/2, v/v). Après 20 minutes, on détruit l'excès d'iode avec une solution aqueuse de NaHSO_3 à 5% et on maintient l'agitation pendant 10 minutes on évapore à sec et on effectue une extraction eau/dichlorométhane. La phase
 30 aqueuse est évaporée puis on effectue une purification en phase inverse (C18), (éluant : $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$). Les fractions contenant le produit sont évaporées et l'échange de contre ion est réalisé par passage sur résine Dowex, Na^+ . On récupère ainsi le triphosphate protégé (0,28 mmol, 56 %).

Déprotection

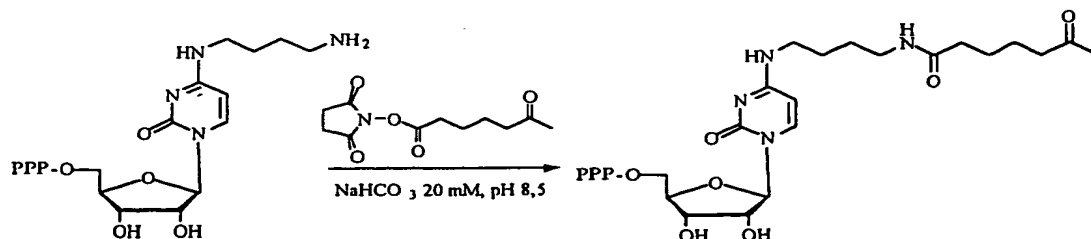
On reprend 0,035 mmol de triphosphate protégé dans 17,5 ml d'eau milli-Q auxquels on rajoute 17,5 ml d'une solution aqueuse de TFA à 25%. On agite pendant 15 minutes puis on évapore et coévapore deux fois avec de l'eau, on reprend dans 10 ml d'eau milli-Q et on neutralise avec de la soude 0,1 M jusqu'à pH 8. Après évaporation, on effectue une purification en C18 (éluant: H₂O ; H₂O / MeOH). Les fractions contenant le produit sont évaporées et dosées. On obtient ainsi 0,022 mmol (63%) de l'adénosine-(N6)-C10-méthylcétone triphosphate 2.

I.3. Synthèse de la cytidine (N4)-C10-méthycétone

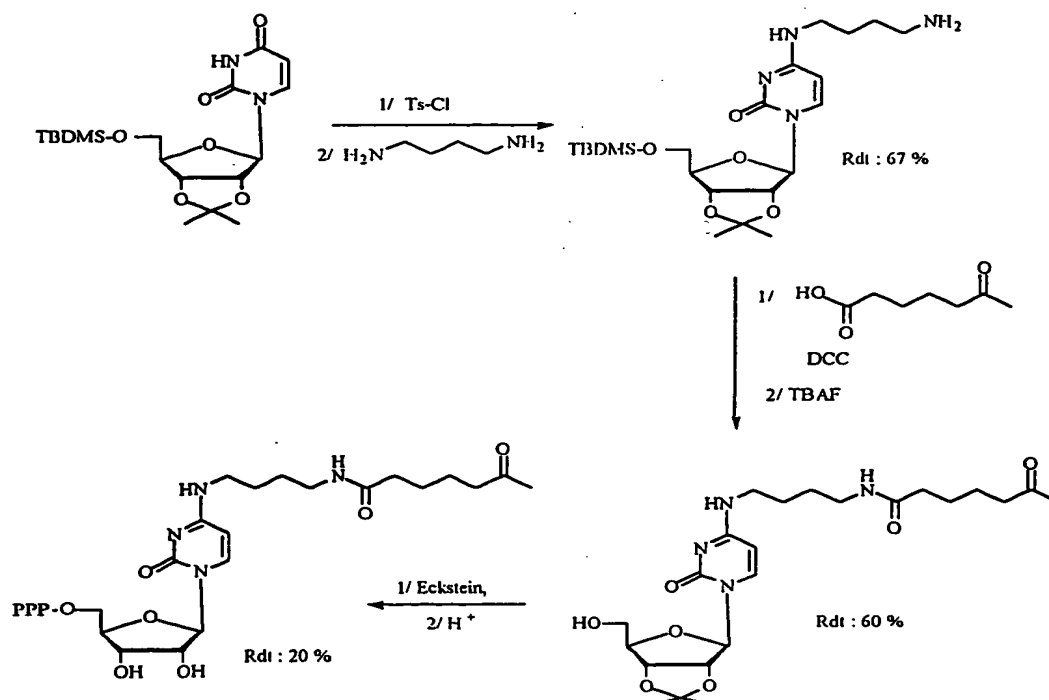


Ce nucléotide a été préparé de deux façons :

- Voie nucléotidique : couplage entre un ester activé de la chaîne méthylcétone et la cytidine triphosphate aminé.



- Voie nucléosidique : synthèse du nucléoside méthylcétone puis phosphorylation par la méthode de Eckstein.

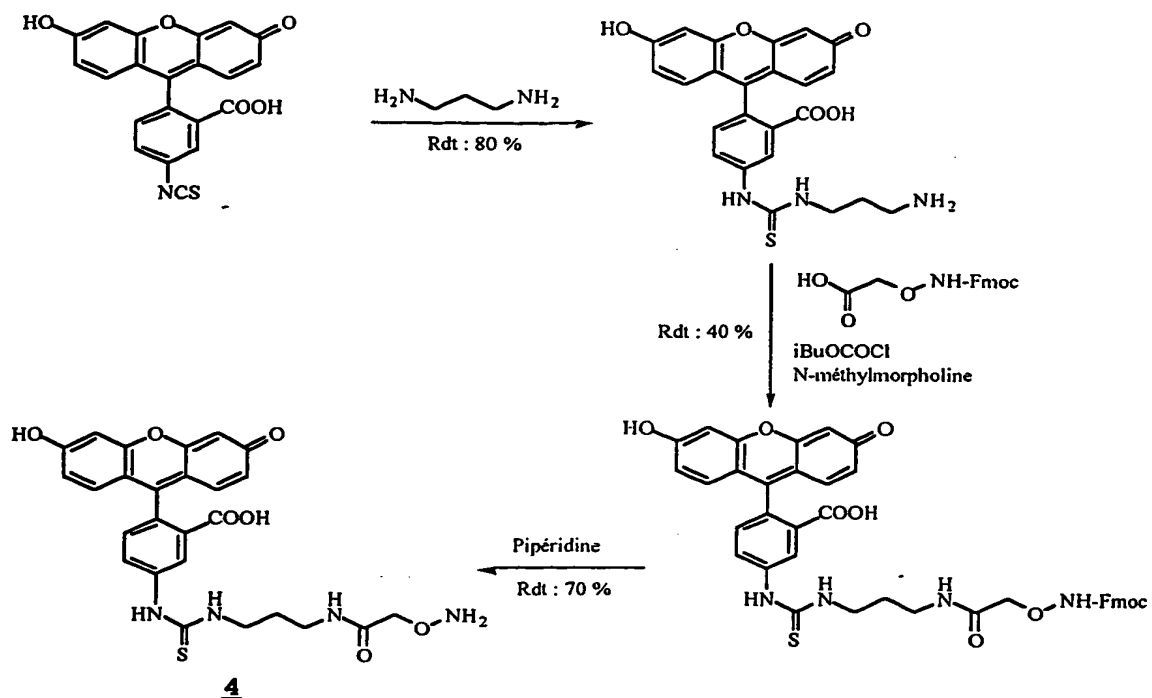


10

EXEMPLE II : SYNTHÈSE DU FLUOROPHORE OXYAMINE 4

II. 1. Schémas de synthèse

L'introduction de la chaîne oxyamine sur la fluorescéine se fait en trois étapes : la première étape est une addition nucléophile du 1,3-diaminopropane sur l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Après purification en phase inverse, le motif oxyamine protégé sous forme de Fmoc est introduit par couplage peptidique. L'oxyamine libre est générée par déprotection en milieu basique.



5

Introduction de la chaîne 1,3-diaminopropane :

On ajoute à 20 ml de DMF anhydre de la diaminopropane (585 μl , 6,96 mmol). On additionne alors, sous argon, goutte à goutte de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), (500 mg, 1,16 mmol) solubilisé dans 7 ml de DMF anhydre. On maintient l'agitation pendant 15 minutes après la fin de l'addition. On évapore à sec et on coévapore deux fois avec de l'eau. Le résidu est chromatographié en phase inverse (C18) : (Eluant : H_2O / MeOH : 1/1).

On récupère ainsi le produit sous forme d'une poudre orange (420 mg, 0,93 mmol, 80 %). Il est caractérisé par RMN du proton, du Carbone 13 et par spectrométrie de masse.

20

Introduction du groupement alcoxyamine protégé :

On solubilise la carboxyalcoxyamine protégée par le Fmoc : $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{ONH}-\text{Fmoc}$ (473 mg, 1,5 mmol dans 10

ml de DMF anhydre). On place à 0°C sous argon. On ajoute alors la N - méthylmorpholine (166 μ l, 1,5 mmol) et après 15 minutes on ajoute la fluorescéine portant la chaîne diaminopropane (350 mg, 0,75 mmol). Après 1 heure de réaction, on évapore à sec la DMF. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH : 85/15 (dépôt solide). On obtient ainsi la fluorescéine-alcoxyamine protégée sous forme d'une poudre orange (227 mg, 0,3 mmol, 40 %). Il est caractérisé par RMN du proton, du Carbone 13 et par spectrométrie de masse.

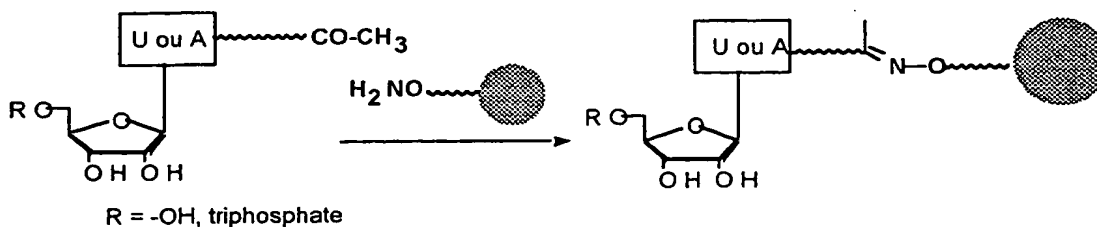
Obtention du marqueur fluorescéine-alcoxyamine 4 :

On solubilise la fluorescéine protégée par le fmoc (100 mg, 0,13 mmol) dans 2 ml de DMF anhydre. On ajoute alors de la pyridine (20 μ l, 0,2 mmol). Après 15 minutes, on évapore à sec puis on effectue une purification en phase inverse C18 (éluant : H₂O /CH₃CN : 1/1 puis CH₃CN). Après évaporation, on obtient le produit sous forme d'une poudre orange (49 mg, 0,09 mmol, 70%). Ce fluorophore a été caractérisé par RMN du proton, RMN 13C et par spectrométrie de masse.

EXEMPLE III : REACTIVITE DES COMPOSES METHYLCETONE AVEC LE FLUOROPHORE

25

La réactivité a été testée au niveau nucléosidique et au niveau nucléotidique :



30

La réaction est réalisée en présence de 1,1 eq. de fluorophore-ONH₂ (4) par rapport au composé méthylcétone. La réaction est rapide et sélective. Au niveau nucléosidique, les adduits ont été caractérisés par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

EXEMPLE IV : INCORPORATION DES URIDINES-METHYLCETONE ET MARQUAGE POST- TRANSCRIPTION

10 IV.1. Description des étapes principales Transcriptions

Les transcriptions ont été réalisées à partir de cible PCR (fragment de l'ARN 16 S de *Mycobacterium Tuberculosis* (Mtb) (Troesch A. et al, J. Clin. Microbiol., 37(1), 49-55, 1999) ou fragment de la reverse transcriptase de HIV (Kozal M.J. et al, Nature Medecine, 2(7), 753-759, 1996) en utilisant la T7 RNA polymérase et différents rapports entre le nucléotide fonctionnalisé et les nucléotides naturels, tout en gardant à 1mM la concentration totale de chaque nucléotide. Ce rapport entre le nucléotide fonctionnalisé et le nucléotide naturel correspondant est exprimé en pourcentage et les rapports utilisés sont en général 0, 30, 70 et 100 %. Le point à 0 % sert de témoin de transcription, puisque dans ce cas il n'y a pas de nucléotide fonctionnalisé et la réaction de transcription comporte les 4 nucléotides naturels. Dans le cas d'un rapport à 100% , cela signifie que le nucléotide fonctionnalisé représente 100% du nucléotide étudié (les trois autres nucléotides nécessaires à la réaction de transcription étant naturellement les nucléotides naturels). Ce rapport de 100% pour un nucléotide fonctionnalisé est le test le plus significatif de la neutralité vis-à-vis d'une réaction enzymatique puisque l'enzyme doit incorporer ce nucléotide

pour fonctionner correctement. Le temps d'incubation de la réaction de transcription est de 1h à 42°C.

Les transcriptions sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (6% acrylamide, 7M urée, 1XTBE). Le volume déposé est de 5 μ l et la migration s'effectue pendant 45 min à 150 V. La visualisation des transcripts, naturels ou fonctionnalisés avec la fonction méthylcétone est réalisée sous lampe UV après coloration au bromure d'éthidium.

10

Dosage

La quantité de transcrits produits dans chaque réaction est déterminée par dosage UV après purification d'un aliquote issu d'une réaction de transcription.

15

Digestion enzymatique

Les transcrits sont purifiés sur des filtres microcon-50 (Amicon, Beverly, MA) pour éliminer l'excès de nucléotides non incorporés. Ils sont ensuite hydrolysés selon le protocole décrit dans la demande de brevet W098/05766 en utilisant la nucléase P1 (Boehringer référence 2362251,2U, 2h à 37°C) et la phosphatase alcaline (Boehringer-Mannheim référence 713023,1U, 1h à 37°C). Les digestions sont menées sur 4.10^{14} copies de transcrits. La composition en nucléosides est déterminée par CLHP en phase inverse, par comparaison avec des standards nucléosidiques composés d'un mélange de nucléosides naturels.

Les conditions CLHP sont les suivantes :

- colonne C18 analytique (250 x 4,6 mm) chauffées à 45°C,

- éluants : A : tampon phosphate de sodium, 50 mM, pH 7 ; B : MeOH/H₂O : 95/5, v/v

- gradient : 0 % de B pendant 10 min, jusqu'à 30 % de B en 10 min, jusqu'à 80 % de B en 10 min, 5 min à 80 % de B, jusqu'à 100 % de B en 2 min.

5 *Marquage*

Le marquage des transcrits est réalisé en utilisant différentes proportions de fluorophore. Le temps de réaction est de 30 min à température ambiante. Le marquage a été effectué sur les transcrits générés à
10 partir de cible Mtb et/ou cible HIV, obtenus par incorporation de 100 % d'un nucléotide méthylcétone. Dans un premier temps, les transcrits marqués sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et visualisés sous UV, avant et après coloration au bromure d'éthidium.

15

Clivage

Avant d'hybrider sur la puce à ADN un clivage des transcrits marqués est réalisé à 65°C pendant 30 min en utilisant de l'imidazole et du chlorure de manganèse
20 (MnCl₂) à une concentration de 30 mM chacun.

Hybridation sur puce à ADN

Après clivage, les fragments obtenus sont hybridés, détectés et analysés sur puce à ADN (Affymetrix,
25 Santa Clara, CA USA) selon le protocole fourni par le constructeur.

Les puces dites « myco » sont conçues pour le reséquençage de la région 213-415 de la séquence M20940 « Genbank » de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*
30 (Troesch A. et al, J. Clin. Microbiol., 37(1), 49-55, 1999). Celles dites « HIV PRT 440 » sont conçues pour le reséquençage des régions RT (reverse transcriptase) et protéase du virus HIV (Kozal M.J. et al, Nature Medecine, 2(7), 753-759, 1996).

10^{14} copies sont hybridées sur la puce dans le cas transcrit Mtb.

5.10^{12} copies sont hybridées sur la puce dans le cas du transcrit HIV.

5

IV. 2. Résultats

Incorporation du nucléotide uridine (C5)-C9-méthylcétone 1 (U-COCH3)

10

Cible utilisée	Rapport entre nucléotide fonctionnalisé U-COCH3 et nucléotide naturel	Transcrits produits (copies / microlitres)
Mtb	0%	$5,0^E+13$
	30%	$5,0^E+13$
	70%	$3,0^E+14$
	100%	$0,8^E+14$
HIV	0%	$0,9^E+12$
	70%	$0,9^E+12$
	100%	$0,9^E+12$

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que le nucléotide uridine-méthylcétone (1) est très bien incorporé par la T7 RNA polymérase. Ceci permet la production de transcrits activés capables de réagir avec un marqueur portant la fonction alcoxyamine.

15

Evaluation de l'incorporation par CLHP

Dans le profil chromatographique de l'hydrolysat des transcrits contenant 100% de U-COCH3 (1) et obtenus à partir de cible Mtb, on retrouve bien le pic qui correspond au nucléoside U-méthylcétone (temps de rétention 26,2 minutes) ce qui signifie que le nucléotide n'est pas modifié pendant les étapes de transcription et

20

de digestion enzymatique. On remarque aussi l'absence du pic correspondant à l'uridine naturelle (temps de rétention 14,97 minutes).

Ceci montre que le nucléotide U-méthylcétone est bien incorporé et peut être utilisé à 100% dans une réaction de transcription.

Evaluation du marquage par gel de polyacrylamide

Les marquages ont été réalisés sur les transcrits bruts générés à partir de cible Mtb en utilisant 100% du nucléotide U-COCH₃ (1). On a fait varier la quantité en fluorophore par rapport au nombre de sites réactifs. Ces rapports sont : 2, 5, 10, 15, 20 et 50 équivalents de fluorophore-ONH₂. 10 équivalents conviennent pour avoir un marquage intense et sélectif.

Sur un gel de marquage en utilisant 5, 10 et 15 eq. du fluorophore avant coloration au BET, on observe un marquage plus ou moins intense selon le nombre d'équivalents de fluorophore utilisé mais quelque soit la quantité de marqueurs utilisée, une bande est visible. On remarque aussi l'apparition de nouvelles bandes à forte dose de fluorophore. Ceci est certainement dû à une densité importance du marqueur sur la cible.

25

Hybridation et analyse des résultats

Les transcrits Mtb et HIV générés à partir de cibles correspondantes, utilisant 100% d' UTP-COCH₃ (1), ont subi les traitements décrits précédemment. Pendant l'étape de clivage, un agent « bloquant » (acétone ou glutaraldéhyde) a été utilisé afin d'éviter une saturation de la puce par l'excès de fluorophore-ONH₂ qui s'adsorbe sur la surface de celle-ci. L'hybridation est réalisée en utilisant la station d'hybridation Gene Chip fluidics

Station (800101 Affymetrix, Santa Clara, CA), les puces et les tampons appropriées, et le protocole fourni par le constructeur.

- 5 Les paramètres pourcentage des bases appelées (Base Call), intensité moyenne des signaux, intensité médiane et le bruit de fond ont été calculés en utilisant le logiciel fourni par le constructeur (GenChip sequence analysis system, référence 900135, Affymetrix, Santa Clara, CA). Les résultats sont donnés dans les deux tableaux ci-dessous. L'intensité du signal est exprimée en RFU (unités de fluorescence du constructeur).

15 Transcrits Mtb :

Cible	Bases appelées (%)	Intensité Moyenne (Rfu)	Intensité médiane (Rfu)
• <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> Transcrits 100% U-COCH3			
100eq Fluo-ONH2 + 100 eq acétone	97,7	3540	3260
20 eq Fluo-ONH2 + 20 eq glutaraldéhyde	92,4	12630	11970

Base appelée : pourcentage de bases correctement identifiées.

Transcrits HIV

Cible	Bases appelées (%)	Intensité moyenne (Rfu)	Intensité Médiane (Rfu)
• HIV Transcrits 70% U-COCH3 10 eq Fluo-ONH2 + 10 eq glutaraldéhyde	98,8	2175	1765
Transcrits 100% U-COCH3 10 eq Fluo-ONH2 + 10 eq glutaraldéhyde	99,0	2675	2090
Transcrits 100% U-COCH3 5 eq Fluo-ONH2 sans bloquant	97,5	4750	4095
Transcrits 100% U-COCH3 5 eq Fluo-ONH2 + 5 eq glutaraldéhyde	98,5	1825	1550
Transcrits 100% U-COCH3 2 eq Fluo-ONH2 sans bloquant	98,3	2380	2035
Transcrits 100% U-COCH3 2 eq Fluo-ONH2 + 2 eq glutaraldéhyde	98,8	620	540

Dans les deux cas Mtb et HIV, on observe un
 5 marquage très efficace avec des intensités supérieures à
 1000 Rfu et des pourcentages de reséquençage (bases
 appelées) voisins de 100%. Ces résultats montrent que la
 réaction entre l'alcoxyamine et méthylcétone, démontrée au
 stade monomère, est aussi spécifique et efficace entre des
 10 séquences ARN contenant des fonctions méthylcétones et le
 marqueur fluorescent portant la fonction alcoxyamine. En
 effet, avec seulement 2 équivalents de marqueur
 alcoxyamine par fonction méthylcétone, on obtient
 suffisamment de fragments de transcrits marqués et
 15 détectables.

EXEMPLE V : INCORPORATION DE LA CYTIDINE-METHYLCETONE 3 ET MARQUAGE POST-TRANSCRIPTION

La cytidine 3 a été incorporée à 100% dans des ARN transcrits de Mtb comme décrit dans l'exemple III. Le
5 procédé de clivage et de marquage est aussi réalisés comme indiqué précédemment.

Cible	Bases appelées (%)	Intensité moyenne (Rfu)	Intensité médiane (Rfu)
<i>Transcrits 100% C-COCH3</i> 20 eq Fluo-ONH2 + 20 eq glutaraldéhyde	94,2	6655	6200

Là aussi, nous observons un marquage très
10 efficace. L'intensité du signal est supérieure à 6000 Rfu et le reséquençage est de 94%. Comme dans l'exemple précédant, ce résultat démontre que la réaction entre l'alcoxyamine et méthylcétone est spécifique et efficace entre des séquences ARN contenant des fonctions
15 méthylcétones et le marqueur fluorescent portant la fonction alcoxyamine.

**EXEMPLE VI : AVANTAGES DE LA FONCTION METHYLCETONE
20 PAR RAPPORT AUX FONCTIONS ALCOXYAMINES, ALDEHYDES, AMINES.**

1. Comparaison entre la fonction alcoxyamine et méthylcétone sur le nucléotide U.

L'uridine portant une chaîne alcoxyamine en
25 position 5 est préparée selon la méthode décrite dans l'exemple 4 de la demande de brevet WO 98/05766. La synthèse du marqueur fluorescéine (FLUO -CHO) aldéhyde est décrite dans l'exemple 18 de la demande WO 98/05766.

Il est important de noter que la fonction
30 alcoxyamine nécessite une protection permanente par le groupement tert-butoxycarbonyl (BOC). Cette fonction est

déprotégée en même temps que l'isopropylidène en 2',3' après phosphorylation en présence de 50% d'acide trifluoroacétique. Ce pourcentage en TFA est nécessaire pour obtenir une déprotection de l'alcoxyamine proche de 90%. Pour obtenir une déprotection totale, des solutions acides plus concentrées sont nécessaires. Dans ces solutions le triphosphate se dégrade très rapidement en diphosphate et monophosphate.

Dans le cas de la fonction méthylcétone, aucune déprotection n'est nécessaire et seulement 25% en TFA sont utilisés pour la déprotection totale de l'isopropylidène en 2',3' après phosphorylation. Avec ce pourcentage en TFA, aucune dégradation n'est observée.

La chaîne méthylcétone est suffisamment hydrophobe même après déprotection, elle contribue ainsi à une bonne séparation du nucléotide triphosphate lors de sa purification par CLHP en phase inverse. Cette séparation est plus difficile dans le cas de la chaîne alcoxyamine.

20 Incorporation et post-marquage de l'UTP-alcoxyamine

Les réactions de transcription, d'hydrolyse enzymatique des transcrits, d'analyse CLHP et de post-marquage sont réalisées dans les mêmes conditions que 25 celles décrites dans l'exemple IV.

La figure montre les rendements de transcription mesurés par la quantité d'amplicons produits (en ordonnée en copies/microlitres) en fonction des 3 30 nucléotides utilisés.

Dans cet exemple, l'incorporation des deux nucléotides, alcoxyamine (U-ONH₂) et méthylcétone (U-COCH₃ composé 1), est étudiée.

35 L'uridine méthylcétone 1 à 100% n'a aucun effet sur le rendement de transcription. Ce rendement est plus

faible lors de l'incorporation du même nucléotide portant la fonction alcoxyamine.

Post-marquage :

CIBLE MTB	Bases appelées (%)	Intensité moyenne (Rfu)	Intensité médiane (Rfu)
TRANSCRITS 100% DE U-ONH2 + 10EQ FLUO-CHO	91,6	5735	5335

5

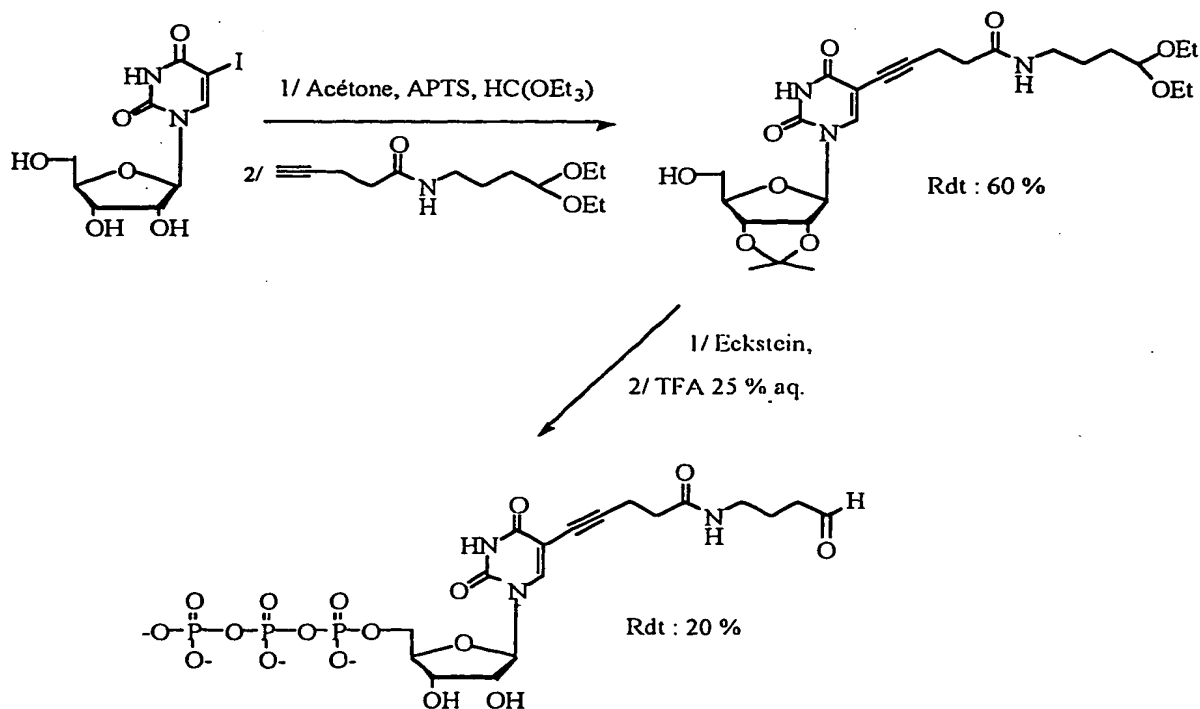
Le pourcentage du reséquençage en utilisant l'uridine-alcoxyamine est plus faible que celui obtenu avec son homologue portant la fonction méthylcétone.

10

2. Comparaison entre la fonction aldéhyde et méthylcétone sur le nucléotide U.

L'uridine à chaîne aldéhyde (U-CHO) est préparée selon le schéma suivant :

15



La chaîne est synthétisée par couplage peptidique entre le 4-aminobutyraldéhyde-diéthylacétal et l'acide 4-pentynoïque. Le couplage de Heck conduit au nucléoside protégé. La phosphorylation suivie d'une déprotection en milieu acide conduit bien au nucléotide attendu. Les produits ont été caractérisés par RMN ^1H et RMN du ^{13}C .

Là encore, la protection de la fonction aldéhydique est nécessaire lors des étapes de couplage et de phosphorylation. La déprotection de l'aldéhyde est réalisée en même temps que celle de l'isopropylidène (25% de TFA), cependant la purification et dessalage du produit déprotégé est plus difficile par rapport à celle du nucléotide méthylcétone (U-COCH₃, composé 1). Le rendement de l'étape de phosphorylation est de 20%.

L'analyse CLHP des transcrits contenant l'UTP-aldéhyde, hydrolysés par la technique enzymatique décrite dans l'exemple IV, montre que le nucléotide aldéhyde est transformé. Cette transformation est certainement due à des interactions de la fonction aldéhyde avec des composants des tampons lors de la transcription ou de d'hydrolyse enzymatique des transcrits.

La réaction du post-marquage, utilisant la fluorescéine-alcoxyamine, ne montre aucun résultat après analyse sur gel et sur puce à ADN des transcrits de mycobacterium. Ceci montre que la transformation de l'aldéhyde est survenue lors de l'étape de transcription ce qui montre l'intérêt de la fonction méthylcétone par rapport à l'aldéhyde.

3. Comparaison entre la fonction amine et méthylcétone sur le nucléotide U.

L'uridine portant une chaîne amine en position 5 (U-NH₂) est préparée selon la méthode décrite dans l'exemple 3 de la demande de brevet WO 98/05766. La protection de la fonction amine par le groupement Boc est dans ce cas aussi nécessaire.

Les rendements de transcription obtenus avec 100% de U-NH₂ sont beaucoup plus faibles que dans le cas de l'utilisation de la fonction méthylcétone et ne permettent pas un reséquençage efficace sur la puce à ADN aussi bien dans le cas de Mtb que dans le cas de HIV.

4. Comparaison entre la fonction amine et méthylcétone sur le nucléotide C.

La cytidine portant une chaîne amine en position 4 (C-NH₂) est préparée selon l'exemple 16 de la demande de brevet WO 98/05766.

Ce nucléotide a été incorporé dans des fragments de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis* par des réactions de transcription réalisées à partir de cible PCR selon le protocole décrit dans l'exemple IV.

L'analyse CLHP des transcrits contenant la C-NH₂, hydrolysés par la technique enzymatique décrite dans l'exemple précédent, montre que le nucléotide aminé est bien incorporé et est intact.

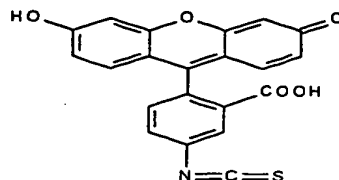
Les rendements de transcription avec différents pourcentages de C-NH₂, aussi déterminés comme indiqué dans l'exemple IV, sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Rapport entre nucléotide fonctionnalisé C-NH ₂ et nucléotide naturel (%)	Transcrits produits (copies / microlitres)
0	3,48 ^{E+13}
70	1,94 ^{E+13}
100	1,51 ^{E+12}

Il est important de noter qu'avec 100% de C-NH₂, la quantité d'amplicons obtenus est 20 fois inférieure à celle obtenue avec une transcription contenant 100% de nucléotide naturel.

Dans la réaction de post-marquage nous avons utilisé comme réactif de marquage l'isothiocyanate de fluorescéine obtenu de chez Sigma-Aldrich (St Quentin Falavier, France).

5



Fluorescéine-isothiocyanate (FITC)

10 Le marquage des transcrits obtenus par incorporation de la C-NH₂ ont été marqués par la FITC, hybridés sur la puce à ADN destinée à l'identification de ces cibles Mtb et les signaux sont analysés selon le protocole décrit précédemment. Les résultats obtenus avec
15 et sans agent bloquant sont donnés dans le tableau ci-dessus.

Cible	Bases appelées (%)	Intensité moyenne (Rfu)
Transcrits non purifiés + 100eq FITC	ND	ND
Transcrits non purifiés + 100eq FITC + 1000eq de diamine bloquant	86	346

ND : non déterminé, la surface de la puce est
20 complètement saturée.

Diamine bloquant : H₂N-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH₂.

Sans addition de chaîne diamine après le marquage,
25 la surface de la puce est complètement saturée par les 100eq de marqueur et les signaux sont inexploitable. Cette saturation est certainement due à l'interaction de

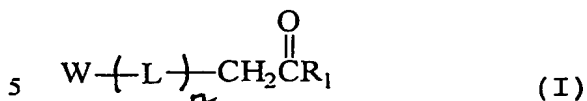
la fonction isothiocyanate avec les fonction amines exocycliques des bases.

L'addition post-marquage de 1000eq de diamine, ayant la même structure que celle porté par la cytidine, 5 semble confirmer cette hypothèse car la surface de la puce n'est plus saturée et 86% de reséquençage sont obtenus. L'intensité du signal est faible par rapport à celle obtenue avec des transcrits contenant la méthylcétone et marqués à la fluorescéine-alcoxyamine.

10 En plus de son effet inhibiteur lors de la transcription, le pourcentage du reséquençage utilisant le C-NH₂ est plus faible que celui obtenu avec son homologue portant la fonction méthylcétone (C-COCH₃, composé 3).

REVENDICATIONS

1/ Nucléotide fonctionnalisé de formule générale
(I) :



dans laquelle

W représente un analogue nucléotidique,

L représente un bras de liaison,

10 n représente un indice égal à 0 ou 1,

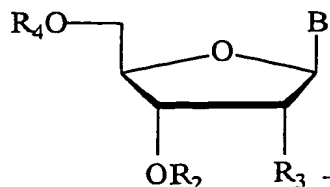
R_1 représente une chaîne alkyle, éventuellement substituée.

2/ Nucléotide fonctionnalisé selon la
15 revendication 1, caractérisé en ce que R_1 représente une chaîne alkyle ayant au plus 6 atomes de carbones.

3/ Nucléotide fonctionnalisé selon la
revendication 2, caractérisé en ce que R_1 représente le
20 groupe méthyle.

4/ Nucléotide fonctionnalisé selon l'une
quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que
 n est égal à 1 et L est une chaîne hydrocarbonée saturée
25 ou insaturée, éventuellement interrompue par au moins une fonction choisie parmi les fonctions amine, amide et oxy.

5/ Nucléotide fonctionnalisé selon l'une
quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que
30 W répond à la formule générale (II)



(II)

dans laquelle :

- 5 - R_2 représente H ou un groupement protecteur,
- R_3 représente H, F, OH, SH, NH_2 , OCH_3 ou OR_5 où
- R_5 représente un groupement protecteur ou une chaîne
- alkyle,
- R_4 représente un radical H, un groupement
- 10 protecteur ou un groupement mono, di ou triphosphate,
- W étant lié à $(L)_n$ par l'intermédiaire de B.

6/ Nucléotide fonctionnalisé selon la
 revendication 5, caractérisé en ce que la base azotée est
 15 la cytosine, l'uracile ou l'adénine.

7/ Nucléotide fonctionnalisé selon la
 revendication 6, caractérisé en ce que R_2 est un H, R_3 est
 un groupement OH et R_4 est un groupement triphosphate.

20

8/ Nucléotide fonctionnalisé selon la
 revendication 5 caractérisé en ce que R_2 est un groupement
 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite et R_3 est H ou
 OR_5 et R_5 est un groupement protecteur utilisé en synthèse
 25 d'oligoribonucléotide et R_4 est un groupement 4,4'-
 diméthoxytrityle.

9/ Polynucléotide fonctionnalisé comprenant au
 moins un nucléotide fonctionnalisé selon l'une quelconque
 30 des revendications précédentes.

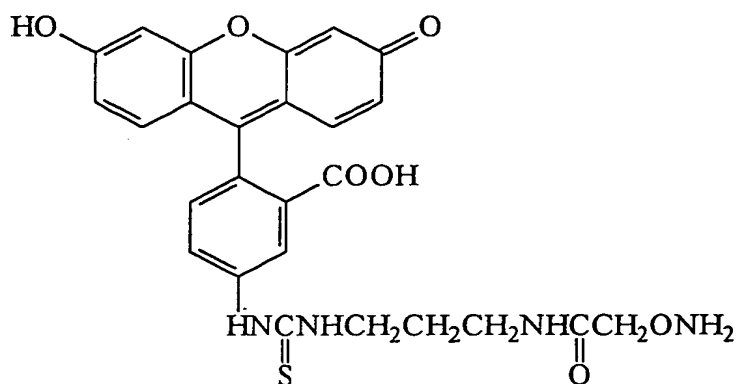
10/ Polynucléotide fonctionnalisé selon la revendication 9 caractérisé en ce que ce polynucléotide est préparé par voie chimique et/ou enzymatique.

5 11/ Polynucléotide fonctionnalisé selon la revendication 10 caractérisé en ce que ce polynucléotide est préparé par une réaction d'amplification enzymatique.

10 12/ Polynucléotide fonctionnalisé marqué caractérisé en ce qu'il comprend au moins un nucléotide fonctionnalisé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dont le groupement alkylcétone a interagi avec un réactif de marquage.

15 13/ Polynucléotide selon la revendication 12, caractérisé en ce que le réactif de marquage comporte une fonction hydrazine ou alcoxyamine.

20 14/ Polynucléotide selon la revendication 13, caractérisé en ce que le réactif de marquage est



25 15/ Procédé de détection d'un acide nucléique cible caractérisé en ce que l'on met en contact cet acide nucléique cible avec au moins un nucléotide fonctionnalisé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, en présence des éléments et dans des conditions nécessaires à

l'obtention d'un polynucléotide, pour obtenir un polynucléotide fonctionnalisé ; on marque le polynucléotide obtenu avec un réactif de marquage ; puis on détecte ledit polynucléotide marqué.

5

16/ Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le polynucléotide fonctionnalisé est obtenu par une réaction d'amplification enzymatique.

10

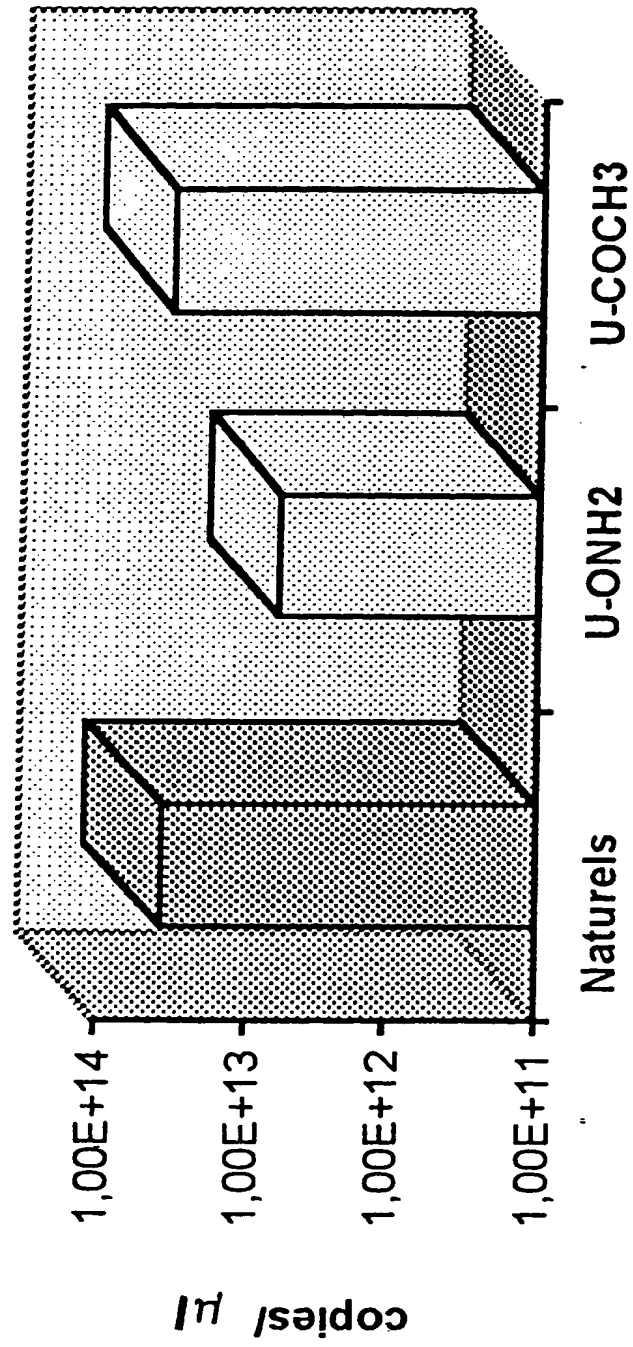
17/ Procédé de détection d'un acide nucléique cible caractérisé en ce que l'on met en contact cet acide nucléique cible avec un polynucléotide fonctionnalisé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 ; on fait réagir le réactif de marquage ; et on détecte la présence

15

de l'acide nucléique cible.

20

18/ Procédé de détection d'un acide nucléique cible caractérisé en ce que l'on dispose d'un polynucléotide marqué selon la revendication 12 ; on met en contact cet acide nucléique cible avec le polynucléotide marqué ; et on détecte la présence de l'acide nucléique cible.





1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100